DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.008

复发尖锐湿疣皮损内 HPV DNA的 PCR的检测*

郭华阳 汪江华 周来新 陈 安 刘盛华 刘 斌 叶治家 金晓琳 (第三军大学医学检验系临床生物化学教研室) 重庆 630038

提 要 目的: 检测复发尖锐湿疣皮损表皮和真皮内的人乳头瘤病毒(HPV)DNA,探讨其反复复发的原因。方法: 对取自 16例复发尖锐湿疣(RCA)患者的 16个皮损组织,用溴化钠溶液分离表皮和真皮,从组织中提取的 DNA和溴化钠溶液分别用聚合酶链反应检测 HPV DNA,阳性病例采用地高辛标记的型特异性寡核苷酸探针斑点杂交法进行 HPV分型。结果: 16例 RCA表皮内均检出了 HPV DNA, HPV_6阳性占 62.5%, HPV_{11}阳性占 25.0%, HPV_{16}阳性占 31.3%, HPV_{18}阳性占 6.3%,所用探针以外型别占 6.3%,混合感染占 37.5%; 4例 RCA真皮内发现有 HPV DNA,其中 HPV_6和 HPV_{11}各占 1例, HPV_{16}有 2例,在这 4例中有 2例半年内再次复发。结论: 提示在某些 RCA真皮内含有 HPV DNA,并可能是少数病例反复复发的原因。

关键词 尖锐湿疣;复发;人乳头瘤病毒;聚合酶链反应
中图法分类号 R752.53

尖锐湿疣是由人乳头瘤病毒(HPV)感染引起的最常见的性传播疾病之一,它治疗顽固,容易复发,也有少数反复复发。国内外研究表明,皮损周围的隐性感染是其主要原因,亚临床感染和再感染是其重要原因[1],除此以外是否尚有其它原因? 本文作一探讨。

1 资料和方法

1.1 临床资料

16例复发尖锐湿疣(RCA)患者,男 7例,女 9例,均为门诊病人。活检确诊后用 CO_2激光彻底治疗,治疗范围: 向皮损周围达到皮损边缘 1.5cm,深达表皮与真皮交界处(刚刚有渗血为度),所有病例均随访半年,3例再次出现复发,复发标准参见文献[2]。同时取 11例正常包皮组织作对照。

1.2 表皮和真皮组织分离及其 DNA提取

活检皮损一部分行石蜡包埋切片作病检,另一部分保持表皮和真皮完整性。将 RCA和正常包皮组织置于含有 0.5mmol/L NaBr溶液的同一离心管中,于 4℃过夜,分别取出 RCA和包皮组织,用镊子分离表皮与真皮,将分离的表皮和真皮分别置于不同的匀浆器中研碎,蛋白酶 K(10g/L) 37℃消化过夜,酚—氯仿制提,无水乙醇沉淀,DNA溶于双蒸水中备用[2]。NaBr溶液亦作检查以除外取材污染因素。

1.3 HPV L_1通用引物和寡核苷酸探针

引物和探针序列参见文献[2],由中科院上海细胞所合成。HPV_6, HPV_{11}, HPV_{16}和 HPV_{18}型特异性寡核苷酸探针采用末端标记法[3]地高辛配基标记(试剂盒为德国宝灵曼公司产品)

1.4 聚合酶链反应(PCR)扩增及其产物电泳[3]

PCR反应总体积为 50μl,含 5× PCR缓冲液 5μl,模板 DNA或 NaBr液 2μl,2 mmol/L dNTPs, 50 pmol/L的 L_1通用引物一对和双蒸水,混匀变性后加 Taq酶 2U,混匀后上覆石蜡油 30μl,在 PCR仪上按 93℃ 30 s, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min循环 30个周期,最后 72℃延伸 10 min。取出 10μl扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳,观察特异性带(扩增产物应为 450 bps左右)。同时设有方法对照和 HPV_6质粒的阳性对照及阴性对照。

1.5 斑点杂交

PCR阳性产物煮沸变性 10 min,取 50 ng点于硝纤维素膜上,自然凉干,37℃ 30min, 80℃ 2h,然后按文献[4]分别进行预杂交、杂交和显色。同时设有阳性对照和阴性对照。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

16例 RCA表皮组织 DNA以 L_1通用引物介导的 PCR扩增后,其产物电泳均出现了约 450 bps的电泳带; 16例 RCA真皮组织 DNA扩增后仅有 4例出现约 450bps的电泳带,见图 1,说明阳性样本组织内含有 HPV DNA。NaBr液和正常包皮组织 DNA扩增后均未出现电泳带。

2.2 斑点杂交结果

16例 RCA表皮组织 DNA的阳性扩增产物分别用地高辛标记的 HPV_6, HPV_{11}, HPV_{16}和 HPV_{18}型特异性寡核苷酸探针斑点杂交后, HPV_6阳性 10例,占 62.5%, HPV_{11}阳性 4例,占 25.0%, HPV_{16}阳性 5例,占 31.3%,见图 2, HPV_{18}阳性 1例,占 6.3%,所用探针以外型别 1例; HPV_6/HPV_{11}混合感染 2例,占 12.5%, HPV_6/HPV_{16}混合感染 3例,占 18.8%, HPV_6/HPV_{11}/HPV_{16}混合感染 1例,占 6.3%。4例 RCA表皮组织 DNA的阳

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39600175

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性扩增产物同样分别用 HPV_6、HPV_{11}、HPV_{16}和 HPV_{18}型特异性寡核苷酸探针斑点杂交后,HPV_6和 HPV_{11}各 1例,HPV_{16}有 2例。(其余图略)

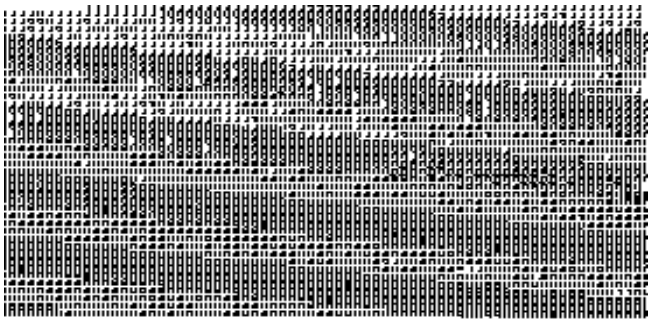


图 1　PCR产物电泳图　(1.5%琼脂糖凝胶)

1,3,4,5:4例真皮组织 DNA为扩增底物,阳性结果(约 450 bps)

2:λDNA/HindⅢ+ EcoRI,大小从下往上,564,831,974,1375,1584,1904,2027,3530,4262,4973,5148,21227 bps

6:正常包皮组织 DNA为扩增底物,阴性对照

Fig 1　Gel electrophoresis of PCR products (1.5% agarose gel)

1,3,4,5 positive results (450 bps) of 4 cases dermal DNA by PCR

2: marker, λDNA/HindⅢ+ EcoRI.

6: negative control of normal foreskin DNA

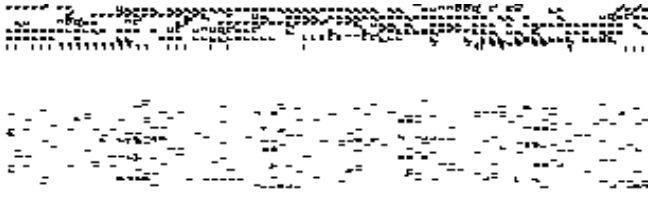


图 2　表皮组织 DNA扩增产物与 HPV_{16}型特异性寡核苷酸探针斑点杂交结果

+,-:分别为阳、阴性对照

1,2,3,4,5,8,10,12,13,15,16 阴性

6,7,9,11,14 阳性

Fig 2　Dot blot hybridization of HPV_{16} oligo nucleotide probe to amplified products of epidermal DNA

+: positive control; -: negative control;

1,2,3,4,5,8,10,12,13,15,16 ngeative;

6,7,9,11,14 positive.

2.3　随访复发情况

16例 RCA彻底治疗后均随访了半年,3例又出现了复发(占 18.8%),其中 2例为 RCA真皮组织内 HPV DNA阳性患者。

3　讨论

HPV感染常常导致增生性改变包括皮肤疣和皮肤癌等,其往往局限于上皮和粘膜。一般用原位杂交的方法观察到 HPV DNA存在于上皮的表皮层[5],由于其敏感性不够,不能够观察到真皮中是否存在 HPV DNA。Kanitakis[6]用 PCR检测到爱滋病患者真皮内 HIV DNA阳性率高达 90%,提示我们利用 PCR检测 RCA真皮组织内的 HPV DNA,结果 16例 RCA真皮组织有 4例阳性。RCA真皮内存在 HPV DNA可以从以下三个方面解释:(1)已知爱滋病患者的表皮内郎格罕细胞,淋巴细胞和单核细胞内含有 HIV,同样这些细胞在 RCA表皮内可能吞噬 HPV DNA,它们可以从表皮游走到真皮。(2)在 RCA中,病理组织学已观察到了机体对 HPV感染的炎症反应,从而可能导致 HPV DNA的释放。我们在用原位杂交技术对 HPV感染的基因诊断中观察到 HPV DNA存在于表皮全层包括整个基底细胞层[5],因而基底细胞的液化变性可以导致 HPV颗粒释放到真皮乳头。(3) HPV病毒血症导致真皮内含有 HPV,由于免疫学方法不能在血清中发现 HPV,因此这种可能性极小。当然,前两种解释即 HPV DNA存在于 RCA真皮内可以进一步用敏感性更高的原位 PCR技术进行准确定位证实。

本研究表明部分(4/16) RCA真皮内含有 HPV DNA,而且随访观察到了真皮内 HPV DNA阳性患者的再次复发(2/4),因 RCA已经彻底治疗达到一定范围,病史和样本采集又有一定针对性,那么基本上可以除外亚临床感染和再感染导致再复发,因而这 2例是由真皮内残留的 HPV DNA导致再复发的可能性较大。诚然,这 2例复发和另 1例真皮内 HPV DNA阴性患者出现复发一样,也可能是由其它原因导致的,有待于进一步研究。

参考文献

1　郭华阳,李文维,谭　骏.尖锐湿疣复发的病因学研究概况.国外医学临床生物化学与检验学分册,1995;16(suppl):1

2　郭华阳,李文维,谭　骏等.PCR及转印杂交对尖锐湿疣复发的病因学研究.中华皮肤科杂志,1995;28(3):155

3　Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 14.18~14.21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4 谭 骏,郭华阳. DNA重组技术及其在基因诊断中的应用. 见蔡文琴,王伯 主编,实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都:四川科学技术出版社,1994 497~510
5 郭华阳,周来新,刘斌等. 复发尖锐湿疣中 HPV基因的原位杂交法分型观察. 第三军医大学学报,1996;18(1):30
6 Kanitakis J, Escarich, Trepo C *et al*. Detection of HIV DNA and RNA in the skin of HIV-infected patients using the PCR. J Invest Dermatol, 1991; 97(1): 91.

(收稿:1996-07-16;修回:1997-01-05)
(编辑 冯崇英)

Detection of HPV DNA in the dermis and epidermis of lesions by PCR in patients with recurring condyloma acuminata

Guo Huayang, Wang Jianghua, Zhou Laixin, Chen An, Liu Shenghua, Liu Bin, Ye Zhigia, Jin Xiaolin (Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objectives: To detect HPV DNA in the dermis and epidermis of lesions by PCR in patients with recurring condyloma acuminata and to explore the reasons of recurrence. Methods: Sixteen lesions were excised from 16 patients with recurring condyloma acuminata (RCA). Dermis was separated from epidermis by treatment with sodium bormide. Both DNA extracted from dermis or epidermis and sodium bormide solution were amplifyed respectively for the presence of HPV DNA using the general primer-mediated polymerase chain reaction(PCR). Of which the positive products were further HPV-typed by dot blot hybridization using digoxigenin-labelled specific subtype oligonucleotide probes. Results: HPV DNA was found in the dermis of four specimens, type 6 or 11 in one and type 16 in two, while in the epidermis of 16 specimens, HPV 6 in 10, HPV 11 in 4, HPV 16 in 5, and HPV 18 or other types in one, two or three types in six, HPV DNA was not detected in the dermis and epidermis from normal foreskin. Two of the 4 positive patients with RCA in the dermis recurred repeatedly in half a year. Conclusions: So there is HPV DNA in the dermis of some lesions and this may explain the repeat recurrence of the diseases in sporadic cases.

Key words condyloma acuminata; recurrence; polymearse chain reaction

(上接 108页)

Gln利用率以及 GA mRNA水平的增幅有不同程度的降低;补充 Gln,能有效地提高血浆 Gln水平,保持脾脏、淋巴结细胞及腹腔巨噬细胞内 Gln正常含量,增加细胞内 Gln利用率、GA活性及其基因表达,进而维持伤后免疫细胞内 Gln较高代谢状态。

(4)闭合性创伤后大鼠脾脏及胸腺重量减轻,脾脏和肠系膜淋巴结细胞的 T、B淋巴细胞增殖反应下降,IL-2生成减少,细胞膜 IL-2R表达受抑;同时,腹腔巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬活性降低,IL-1的产量下降;提示闭合性创伤大鼠免疫功能受到明显抑制,但补充 Gln组动物的免疫抑制程度明显轻于非补充组。我们认为,体内 Gln缺乏可进一步加重创伤后免疫抑制,延缓免疫受抑的恢复;补充 Gln能明显减少上述免疫功能指标的受抑程度,缩短免疫受抑的持续时间;提示伤后给予外源性 Gln能明显改善免疫细胞功能。

(5)创伤后大鼠脾脏、淋巴结及腹腔巨噬细胞丙二醛(MDA)含量增加,还原型谷胱甘肽(GSH)水平下降,表明创伤后体内氧自由基产生增多,抗氧化能力减弱;补充 Gln有助于保持血浆和免疫组织细胞内 GSH水平,增强机体抗氧化能力,降低伤后体内过氧化脂质水平,减少伤后免疫组织细胞的氧化性损伤,这可能是 Gln改善创伤后免疫功能受抑的机理之一。

(6)补充 Gln可减少创伤感染后脾脏和肾脏绿脓杆菌的检出率,提高创伤感染大鼠的存活率,原因可能与其改善了免疫抑制状态有关,包括提高创伤感染后免疫组织的抗氧化能力,减少 TNF的生成,降低机体感染及炎性反应程度等。

(7)手术创伤病人 PBMC对 Gln的利用率加快,GA活性升高;而血浆 Gln浓度术后第 1天即明显下降,若不补充 Gln,术后第 6天仍将持续低水平,同时,细胞内 Gln含量也明显降低,导致 GA活性及 Gln利用率下降;肠内补充 Gln,能有效地增加术后血浆 Gln的浓度,维持 PBMC内 Gln的正常含量,提高 PBMC内 Gln的代谢水平。

(8)补充 Gln对手术病人 PBMC经 PHA刺激的增殖反应、IL-2的生成和细胞膜 IL-2R的表达,均有一定的促进作用;术后血浆 GSH浓度明显下降,MDA含量明显增加,表明手术创伤后机体消耗 GSH增加或和产生 GSH减少,补充 Gln能维持术后血浆 GSH正常含量,增强术后组织抗氧化损伤能力,这可能也是 Gln改善术后 PBMC功能的原因之一。

关键词 创伤;创伤感染;淋巴细胞;巨噬细胞;谷氨酰胺代谢;谷氨酰胺酶;基因表达;免疫功能;谷胱甘肽;脂质过氧化;
中图法分类号 R641
(收稿:1996-12-25;修回:1997-01-24)
(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net